

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta tropického zemědělství**



Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta tropického  
zemědělství**

**Mikropopagace lípie sladké**

*(Lippia dulcis Trev.)*

**Bakalářská práce**

**Praha 2016**

**Vedoucí bakalářské práce:**  
**doc. Dr Ing. Eloy Fernández Cusimamani**

**Vypracovala:**  
**Alžběta Zubíková**

## **Prohlášení**

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci na téma „Mikropropagace lípie sladké (*Lippia dulcis* Trev.) vypracovala samostatně a všechny použité literární prameny jsem řádně uvedla v referencích. Souhlasím, aby práce byla uvedena v knihovně ČZU v Praze a zpřístupněna ke studijním účelům.

V Praze dne 15.4.2016

.....

Alžběta Zubíková

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce doc. Dr. Ing. Eloyovi Fernándezovi Cusimamanimu za odborné vedení a rady při zpracování bakalářské práce.

Mé poděkování patří i České zemědělské univerzitě v Praze, zejména fakultě tropického zemědělství, která mi umožnila pracovat v laboratoři rostlinných explantátů.

Děkuji také panu Radimu Slavičkovi za poskytnutí rostlinného materiálu a informací o množení a pěstování rostliny.

Na konec bych chtěla poděkovat svému dědečkovi doc. MUDr. Vladislavu Marešovi, DrSc. nejen za poznámky k mé bakalářské práci, ale hlavně za veškerý zájem o mé studium.

## Abstrakt

Lípie sladká (*Lippia dulcis* Trev., Sporýšovité) je vytrvalá bylina s plazivým stonkem pocházející ze Střední Ameriky. Je známá nejen svými léčivými účinky při problémech s dýchací či trávicí soustavou, ale také svou sladkou chutí, kterou způsobuje terpen hernandulcin, díky kterému jsou listy Lípie 1000x sladší než cukr. Generativně se rostlina rozmnožuje pomocí semen a vegetativně řízkami.

Hlavním cílem této práce bylo sledování vlivu cytokininů kinetinu (KIN) a 6-benzylaminopurinu (BAP) s přídavkem auxinu indolyl-3-octovou kyselinou (IAA) na růst a regeneraci rostlin z nodálních segmentů *Lippia dulcis* Trev. v *in vitro* podmínkách.

Nodální segmenty byly kultivovány na 6-ti variantách MS média s přídavkem růstových regulátorů v koncentracích 0,5; 0,75 a 1,0 mg/l pro BAP a KIN s kombinací 0,5 mg/l IAA a jedna varianta čistého MS média jako kontrolní. Kultivace probíhala po dobu 35 dní (doba subkultivace) a každých 7 dní bylo prováděno měření. Hodnotily se následující parametry: regenerace, počet výhonů, délka výhonů, počet nodů, počet a délka kořenů.

Výsledky měření ukazují, že kombinace růstových regulátorů auxin + cytokinin nemají pozitivní vliv na růst a regeneraci *Lippia dulcis* Trev. v *in vitro* podmínkách. K nejlepší regeneraci (100%), růstu (při průměrné délce výhonů  $3,05 \pm 1,42$ ) a nejvyššímu počtu nově vytvořených nodů ( $5,79 \pm 2,4$ ) docházelo u explantátů kultivovaných na čistém MS médiu bez přídavků růstových regulátorů. Mezi variantou s čistým MS médiem a variantami s přídavkem růstových regulátorů jsou statisticky významné rozdíly, avšak bez příznivého vlivu na vývoj nodálních segmentů.

**Klíčová slova:** *Lippia dulcis* Trev., mikropropagace, nodální segmenty, růstové regulátory.

## Abstract

*Lippia dulcis* Trev. (Verbenacea) is a perennial herb with a creeping stem from Central America. It is known for its healing properties for problems with the respiratory or digestive system, but also its sweet taste, which causes terpene hernandulcin because of which the leaves of *Lippia dulcis* Trev. are 1,000 times sweeter than sugar. Generatively, the plant reproduces by seeds and vegetatively by cuttings.

The main objective of this study was to investigate the influence of cytokinins kinetin (KIN) and 6-benzylaminopurine (BAP) with the addition of auxin indole-3-acetic acid (IAA) on the growth and regeneration of plants from nodal segments *Lippia dulcis* Trev. *in vitro* conditions.

Nodal segments were cultured on 6-variants of MS medium supplemented with growth regulators at concentrations of 0.5; 0.75 and 1.0 mg / l BAP and KIN with combination 0.5 mg / l IAA and one variant of pure MS medium as a control. Nodal explants were cultured for 35 days (the time of subculturing) and measured every 7 days. The following parameters were evaluated: regeneration, number of shoots, length of shoots, number of nodes, number and length of roots.

The measurement results show that a combination of growth regulators auxin-cytokinin have no positive influence on the growth and regeneration *Lippia dulcis* Trev. *in vitro* conditions. The best regeneration (100%), growth (on an average length of the shoots  $3.05 \pm 1.42$ ) and the highest number of newly created points ( $5.79 \pm 2.4$ ) occurred at the explants cultured on a clean MS medium without addition of growth regulators. Among the variant with pure MS and media variants with the addition of growth regulators are statistically significant differences, but without a favorable influence on the development of nodal explants.

**Keywords:** *Lippia dulcis*, micropropagation, nodal segments, plant growth regulator

# Obsah

Seznam zkratk .....	vii
Seznam obrázků, tabulek a grafů .....	viii
1. Úvod .....	1
2. Literární rešerže .....	2
2.1. Taxonomie .....	2
2.1.1. Čeleď <i>Verbenaceae</i> .....	2
2.1.2. Rod <i>Lippia</i> .....	2
2.2 Množení a pěstování rodu <i>Lippia</i> .....	6
2.3 <i>Lippia dulcis</i> Trev. ....	7
2.3.1 Botanický a morfologický popis .....	7
2.3.2 Původ a rozšíření .....	8
2.3.3 Tradiční využití .....	8
2.3.4 Chemické složení .....	9
2.3.5 <i>In vitro</i> množení <i>Lippia dulcis</i> Trev. ....	11
3. Cíl práce .....	12
4. Materiál a metodika .....	13
4.1. Rostlinný materiál .....	13
4.2. Metodika .....	13
4.2.1 Odvození aseptické kultury .....	13
4.2.2 Množení nodálních segmentů .....	15
4.2.3 Vytvoření pokusných variant .....	17
4.2.6 Hodnocení výsledků .....	17
5. Výsledky a diskuze .....	19
5.1 Odvození aseptické kultury a namnožení rostlinného materiálu .....	19
5.2. Vliv růstových regulátorů .....	19
7. Závěr .....	30
8. Reference .....	31

## Seznam zkratek

BAP	6-Benzylaminopurin (cytokinin)
B5	Kultivační médium (Gamborg <i>et al.</i> , 1968)
IAA	Indolyl-3-octová kyselina (auxin)
IBA	Indolyl -3-máselná kyselina (auxin)
KIN	Kinetin (cytokinin)
KOH	Hydroxid draselný
MS	Kultivační médium (Murashige & Skoog, 1962)
NaClO	Chlornan sodný
NAA	$\alpha$ - naftyloctová kyselina
RR	Růstové regulátory
WPM	Woody Plant Medium (Lloyd & McCown, 1981), kultivační médium

## Seznam obrázků, tabulek a grafů

<b>Obrázek 1</b> <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E.Brown.....	4
<b>Obrázek 2</b> <i>Lippia organodes</i> H.B.K.....	4
<b>Obrázek 3</b> <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.....	5
<b>Obrázek 4</b> <i>Lippia geminata</i> H.B.K.....	5
<b>Obrázek 5</b> <i>Lippia dulcis</i> Trev.....	7
<b>Obrázek 6</b> Rozšíření <i>Lippia dulcis</i> Trev.....	8
<b>Obrázek 7</b> Hernandulcin .....	9
<b>Obrázek 8</b> Převod nodální segmentu rostliny <i>Lippia dulcis</i> Trev. na MS médium .....	14
<b>Obrázek 9</b> Ukázka kontaminace .....	16
<b>Obrázek 10</b> Fotodokumentace z experimentu mikropropagace <i>Lippia dulcis</i> Trev., regenerace z nodálních explantátů kultivovaných na MS médiu s přísady 0,5 mg/l KIN+ 0,5 mg/l IAA; 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA a čistém MS jako kontrolní varianta po 30-ti dnech kultivace .....	27
<b>Obrázek 11</b> Fotodokumentace z experimentu mikropropagace <i>Lippia dulcis</i> Trev., regenerace z nodálních explantátů kultivovaných na MS médiu s přísady 0,75 mg/l KIN+ 0,5 mg/l IAA; 0,75 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA a čistém MS jako kontrolní varianta po 30-ti dnech kultivace.....	28
<b>Obrázek 12</b> Fotodokumentace z experimentu mikropropagace <i>Lippia dulcis</i> Trev., regenerace z nodálních explantátů kultivovaných na MS médiu s přísady 1,0 mg/l KIN+ 0,5 mg/l IAA; 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA a čistém MS jako kontrolní varianta po 30-ti dnech kultivace .....	29
<b>Tabulka 1</b> Varianty kultivačních médií .....	17
<b>Tabulka 2</b> Vliv růstových hormonů na růst nodálních explantátů <i>Lippia dulcis</i> Trev. v <i>in vitro</i> podmínkách (Kruskal-wallisův test).....	23
<b>Tabulka 3</b> Účinnost mikropropagace v závislosti na „koeficientu mikropropagace“ orgánových kultur <i>Lippia dulcis</i> Trev. z složených z nodálních segmentů, kultivovaných s přísady růstových hormonů .....	24



<b>Graf 1</b> Vliv auxinu a cytokininů na průměrnou délku výhonů u <i>Lippia dulcis</i> Trev. po 35 dnech kultivace .....	25
<b>Graf 2</b> Vliv auxinu a cytokininů na počet nodů u <i>Lippia dulcis</i> Trev. po 35 dnech kultivace .....	25
<b>Graf 3</b> Vliv auxinu a cytokininů na počet kořenů u <i>Lippia dulcis</i> Trev. po 35 dnech kultivace .....	26
<b>Graf 4</b> Vliv auxinu a cytokininů na průměrnou délku kořenů u <i>Lippia dulcis</i> Trev. po 35 dnech kultivace .....	26

## 1. Úvod

---

Lípie sladká (*Lippia dulcis* Trev.) je trvalka pocházející ze Střední Ameriky (Small, 2006) známá nejen svou sladkou chutí, ale především svými léčivými účinky při problémech s dýchacím či trávicím traktem. Sladkou chuť způsobuje látka hernandulcin. Patří do skupiny terpenů, přesněji mezi seskviterpeny a je 1000x sladší než cukr (Pascual *et al.*, 2001). Lípie sladká se řadí do čeledi sporýšovitých (*Verbenaceae*), do rodu *Lippia* a je známá také pod jmény Aztécký cukr, Honey Herb, Tzopelic xihuitl, Aloisie sladká nebo Yerba dulcis.

Rostlinu poprvé popsal španělský lékař Francisco Hernández, který byl poslán v roce 1570 španělským králem, Filipem II., aby prozkoumal léčivé rostliny Nového Španělska. V roce 1651 vyšla jeho práce, ve které popsal a ilustroval mimořádně sladkou rostlinu pod jménem Tzopelic xihuitl. Avšak její využití je známé již z doby Aztéků (Compadre, 1986).

Do rodu *Lippia* patří přibližně dalších 200 druhů rostlin. Můžeme je nalézt v oblastech Jižní a Střední Ameriky, v Západní Africe i v Austrálii (Murin, 1993; Pascual *et al.*, 2001). Jejich hlavní využití je v oblastech tradiční medicíny, při léčbě dýchacích, trávicích problémech, při popáleninách, ale využívají se i jako kuchyňské bylinky (Pascual *et al.*, 2001; Small, 2006).

Lípie sladká se množí generativně pomocí semen (Adams, 2014) a také vegetativně, například řízkou nebo hříšením. V předložené bakalářské práci se využívá metody vegetativního množení explantátových kultur ve sterilních podmínkách tzv. mikropropagace (Kovač, 1995) a sleduje se vliv růstových regulátorů – auxinů a cytokininů na regeneraci nodálních segmentů *Lippia dulcis* Trev.. Mikropropagace je běžná a účinná metoda množení léčivých rostlin, při níž můžeme růst rostlin velice dobře ovlivňovat a získat vysoký počet jedinců.

## 2. Literární rešerže

---

### 2.1. Taxonomie

Taxonomické zařazení druhu *Lippia dulcis* Trev.:

Říše:	rostliny ( <i>Plantae</i> )
Oddělení:	krytosemenné ( <i>Magnoliophyta</i> )
Třída:	vyšší dvouděložné ( <i>Magnoliopsida</i> )
Řád:	hluchavkotvaré ( <i>Lamiales</i> )
Čeleď:	sporýšovité ( <i>Verbenaceae</i> )
Rod:	lipia ( <i>Lippia</i> )
Druh:	lípie sladká ( <i>Lippia dulcis</i> Trev.)

(Global Biodiversity Information Facility, 2013)

#### 2.1.1. Čeleď *Verbenaceae*

*Verbenaceae*, česky sporýšovité, je čeleď zahrnující byliny, dřeviny i liány. Jsou rozšířeny hlavně v oblastech tropů a subtropů. Mají vstřícné nebo přeslenité listy a jejich květy vytvářejí hroznovitá květenství (Novák & Skalický, 2012). Do čeledi patří 32 rodů a 480 druhů, největší zastoupení má rod *Lippia*, který zahrnuje 88 druhů, z toho 68 endemických. Nejvíce druhů patřících do této čeledi se vyskytuje na území Brazílie (Salimena, 2015).

#### 2.1.2. Rod *Lippia*

Roku 1753 jako první popsal rod *Lippia* Carl Linné s jedním druhem *Lippia americana* z Mexika. V roce 1805 byl rod *Lippia* zařazen do čeledi Sporýšovitých (*Verbenaceae*) francouzským přírodovědcem Jean Henri Jaume Saint-Hilaire. Později byl rod *Lippia* zařazen do kmene *Lantanaceae* (Murin, 1993). Rod je pojmenován po italském botanikovi a přírodovědci Augustinovi Lippi, který byl ve věku 23 let zavražděn v Etiopii roku 1701.

Klasifikaci toho rodu se zabývalo mnoho vědců, hlavně kvůli znakovým podobnostem rostlin mezi jednotlivými rody řadící se do kmene *Lantanaceae*. Nejvýznamnějším vědcem, který se zabýval touto problematikou je americký botanik Harold Norman Moldenke (Pascual *et al.*, 2001).

Rod *Lippia* zahrnuje přibližně 200 druhů bylin, keřů ale i některé druhy stromů. Rozšířeny jsou zejména v Jižní a Střední Americe, v Západní Africe i v Austrálii

(Murin, 1993; Gupta *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2001). Jsou známy pro své léčivé účinky a nejvýznamnější využití mají proti chorobám dýchacího a trávicího traktu. Byly zaznamenány i jejich antimalarické, cytostatické a antimikrobiální účinky. Příkladem je inhibice aktivit *Escherichia coli* či *Staphylococcus aureus*.

Mnoho druhů z rodu *Lippia* bylo zkoumáno pomocí chromatografických technik za účelem bližšího popisu jednotlivých složek esenciálních olejů, které tyto rostliny obsahují. Bylo zjištěno, že ve vysoké frekvenci obsahují hlavně terpeny: limonen, cymen, kafr, thymol a linalool.

Nejčastěji jsou využívány nadzemní části rostlin, listy a květy, ze kterých se připravují odvary a výtažky, které se podávají perorálně (Pascual *et al.*, 2001).

Nejnámější rostlinou tohoto rodu je *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown (Pascual *et al.*, 2001) nebo také Aloisie bílá (Small, 2006) (viz Obrázek 1), která se vyskytuje na Floridě, v Texasu, Střední a Jižní Americe. Využívá se na léčbu kašle, bronchitidy, chřipky, astmatu, bolesti žaludku, zažívacích potíží či syfilisu. V Guatemale je využívána i na léčení vředů, popálenin a ran. V Brazílii jako sedativum (Pascual *et al.*, 2001). Je ceněna i jako koření při vaření či výrobu čaje. Jedná se o pomalu rostoucí keř, který špatně snáší mrazivé podmínky. Čerstvé listy mají citrónové aroma.

Mezi další známé rostliny rodu *Lippia* patří také Aloisie vonná (*Lippia graveolens* H.B.K., viz obrázek 2), bíle kvetoucí keř, dorůstající až do výšky 2,5 metru. Nejčastěji se vyskytuje v aridních oblastech Severní a Střední Ameriky. Je využívána při vaření jako koření, jelikož silně voní po dobromysli, proto se jí říká mexické oregano. Také se z ní vaří čaj a využívají se její silice v potravinářském a farmaceutickém průmyslu (Small, 2006).

Z *Lippia origanoides* H.B.K. (viz Obrázek 3) se ve Venezuele využívá odvar ke stimulaci chutě k jídlu.

*Lippia geminata* H.B.K. (viz Obrázek 4) pomáhá při léčbě kapavky a syfilisu, také se z ní dělá čaj, který má protikřečové účinky (Pascual *et al.*, 2001).

Využití a význam *Lippia dulcis* Trev., je popsán v kapitole 2.3.3 Tradiční využití.



**Obrázek 1** *Lippia alba* (Mill.) N.E.Brown

Autor: Marcelo Guerra Santos, 2015



**Obrázek 2** *Lippia origanodes* H.B.K

Autor: Marla Ignez Calhau, 2013



**Obrázek 3** *Lippia graveolens* H.B.K

Autor: Carlos Velazco, 2006



**Obrázek 4** *Lippia geminata* H.B.K.

Autor: Khaled Saifullah Taronga, 2015

## 2.2 Množení a pěstování rodu *Lippia*

*Lippia graveolens* H.B.K. se množí generativně pomocí semen, ale také vegetativně řízkem z bazálních a uzlových částí měkkého dřeva, které se odebírají na jaře či na začátku léta a mohou se nechat zakořenit ve vlhkém písku (Small, 2006). *Lippia dulcis* Trev. se množí generativně pomocí semen (Adams *et al.*, 2014).

Pro pěstování ve venkovních podmínkách je nejlepší dobře propustná půda, přiměřeně úživná. V místě původního výskytu, v Mexiku, jsou většinou suché písčité půdy, na kterých rostliny rodu *Lippia*, například Aloisie vonná (*Lippia graveolens* H.B.K.), rostou. V oblastech mírného pásma jsou nejčastěji pěstovány v květináčích, jako pokojové rostliny nebo ve sklenicích. Na přezimování se musí přesouvat dovnitř na světlé místo. Příliš mnoho vody a bohatá půda, ale způsobují růst větších listů a výhonků, na úkor vůně a chuti (Small, 2006).

## 2.3 *Lippia dulcis* Trev.

### 2.3.1 Botanický a morfologický popis

*Lippia dulcis* Trev. je vytrvalá bylina, s plazivým nebo poléhavým stonkem. Báze částečně dřevnatí. V mládí jsou stonky chlupaté a později olysají (Grulich, 2015). Listy vyrůstají ve vstřícném postavení (Compadre, 1986). Mají vejčitý nebo kopinatý tvar. Jsou 1,5 -7 cm dlouhé a 1-4 cm široké. Listy jsou v horních  $\frac{3}{4}$  vroubkované, na vrcholu špičaté a na bázi náhle zúžené. Na rubu jsou hustě pýřité a na líci mají jednoduché chlupy (Grulich, 2015). Listy i květy jsou silně aromatizované (Compadre, 1986).

Tvoří klasovitá nebo stroboulovitá květenství, která vyrůstají jednotlivě v paždí listů na 2-5 cm dlouhých stopkách. Květenství jsou většinou 0,4-1 cm dlouhá, za plodu se prodlužují. Listeny jsou 3-4 mm dlouhé a jsou vejčité až kopinaté (Grulich, 2015).

Květy jsou bílé a drobné (Compadre, 1986). Většinou 4-četné květy. Kalich je přibližně 1 mm dlouhý s hustými kratičkými chlupy. Koruna je řepicovitá s trubkou asi 3 mm dlouhou a nestejnými cípy. Květy mají 4 tyčinky, blizna je dvoulaločná. Plodem lípie jsou dvě drobné tvrdky (Grulich, 2015) (viz Obrázek 5).



**Obrázek 5** *Lippia dulcis* Trev.

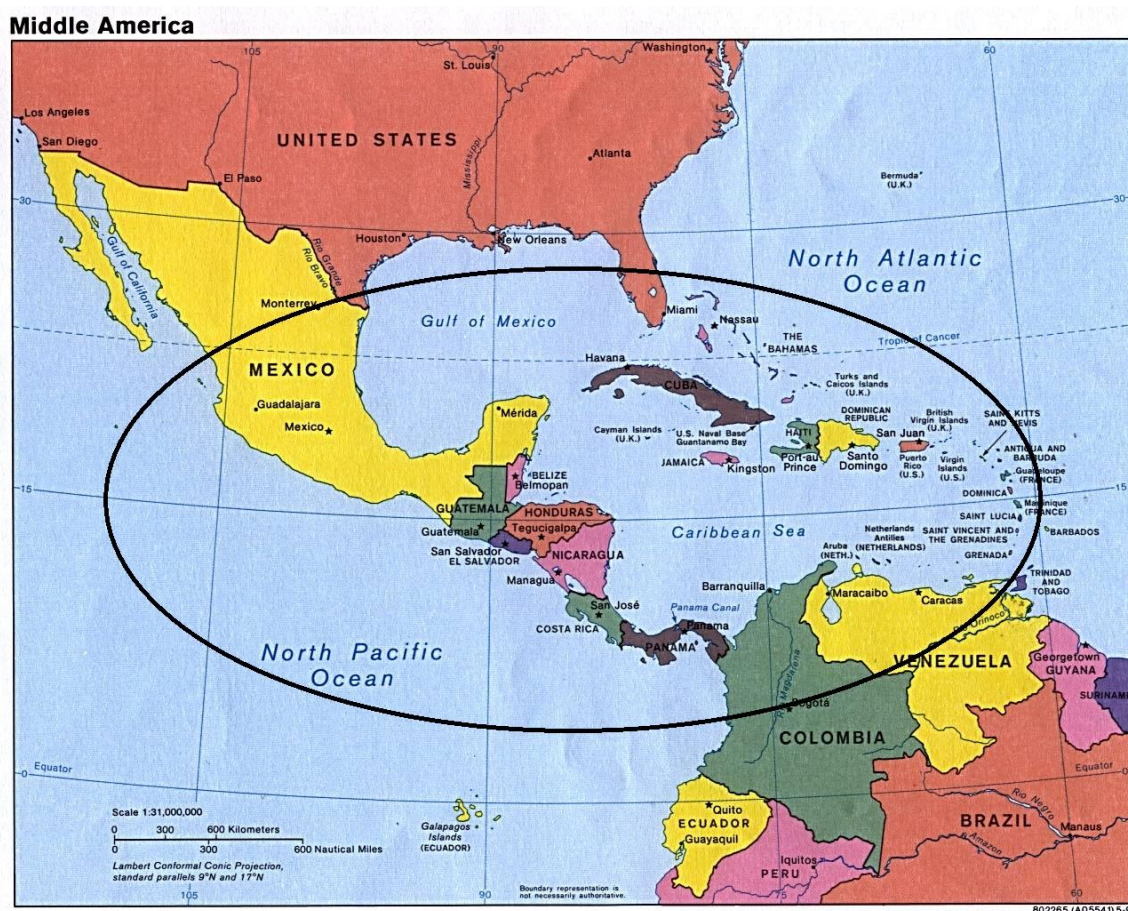
Autor: Jindřiška Vančurová, 2015



### 2.3.2 Původ a rozšíření

Lípě sladká se přirozeně vyskytuje Severní Americe na území Mexika, dále se s ní můžeme setkat i ve Střední a Jižní Americe na Kubě, Portoriku, ale také v Belize, Kostarice, Guatemale, Hondurasu, Panamě, Venezuele a Kolumbii (GBIF Secretariat, 2016) a Dominikánské republice (Compadre *et al.*, 1986) (viz Obrázek 6).

Roste v nadmořských výškách do 1800 m, ve vlhkých houštinách, na okraji lesů, poblíž řek a rybníků. Vyskytuje se i na pasekách a loukách (Souto-Bachiller, 1997).



Obrázek 6 Rozšíření *Lippia dulcis* Trev.

Zdroj: [www.mapasveta.info](http://www.mapasveta.info)

### 2.3.3 Tradiční využití

Lípě sladká začala být využívána na léčbu kašle již v době Aztécké říše. Postupem času si našla využití i v mnoha dalších oblastech nejen při léčbě respiračních onemocnění jako je chřipka, bronchitid či astma, ale i při onemocněních trávicího

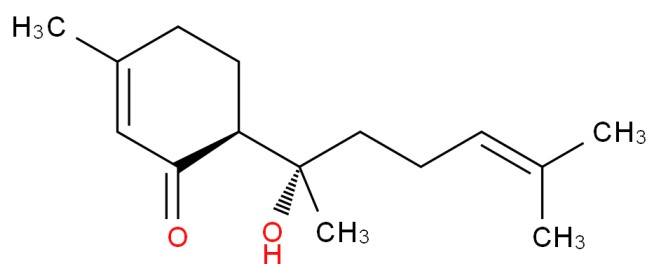
traktu, při bolesti žaludku, průjmech anebo úplavici. V Guatemale se využívá jako močopudná bylina. Na Kubě z ní vyrábějí cigaretový papír. Dále jsou známy její antipyretické, protizánětlivé a analgetické účinky (Pascual *et al.*, 2001). Ve Střední Americe se užívá k léčbě černého kašle. V Mexiku k vyvolání potratů.

Využívá se také, jako přírodní sladilo čaje a jiných nápojů, přidává se i do salátů nebo se žvýká jako kořeny lékořice (Small, 2006).

### 2.3.4 Chemické složení

Největší zastoupení mají ve složení esenciálních olejů *Lippia dulcis* Trev. terpeny, mono- a seskviterpeny (Compadre *et al.*, 1986). Z monoterpenů je to limonen, kafr, kamfen, terpinolen, lippiol,  $\alpha$ -pinen. Z seskviterpenů  $\alpha$ -copaene,  $\beta$  – karyofylen,  $\delta$ -kadinen, (+) – hernandulcin, (+)- 4 $\beta$ - hernandulcin, (-)-epihernandulcin.

Nejvýznamnější látkou je hernandulcin (viz Obrázek 7), intenzivně sladká látka, díky které jsou listy *Lippia dulcis* Trev. 1000x sladší než cukr (Pascual *et al.*, 2001). Biosyntéza hernandulcinu zatím není zcela objasněna. Jako první krok biochemického procesu je syntéza (+) –epi-  $\alpha$ -bisabolol z farnesyl difosfátu. Předpokládá se, že (+) –epi- $\alpha$ -bisabolol je dále katalyzován a tím vzniká unikátní seskviterpen hernandulcin, který je nejen sladký, ale také se při laboratorní experimentech prokázalo, že nemá žádné karcinogenní a mutační účinky (Attia *et al.*, 2012).



**Obrázek 7** Hernandulcin

Zdroj: en.chembase.cn

*Lippia dulcis* Trev. obsahuje také kamfor, který má antipiruetické, antiseptické a analgetické účinky, bohužel je to ale také látka toxická (Zuccardini, 2009). Proto se nedoporučuje její nadměrné užívání a to zejména v těhotenství. Kamfor proniká skrz

placentu a má velice negativní až smrtelný vliv na plod, proto se dříve *Lippia dulcis* Trev. využívala k vyvolání potratů (Small, 2006).

Obsah kamforu a hernandulcinu v rostlinách se mění podle místa původu. Bylo zjištěno, že rostliny ze semen pocházejících z Panamy obsahovaly 0,02 % kamforu a 14,5 % hernandulcinu, naproti tomu rostliny z Portorika neobsahovaly žádný kamfor a jen 0,154 % hernandulcinu.

Dále *Lippia dulcis* Trev. obsahuje i deriváty kyseliny kávové, například verbascosid a acteosid, ale také alkaloidy.

Složení rostlin *Lippia dulcis* Trev. se mění na základě podmínek, které působí na daném stanovišti výskytu. Rostliny sesbírané na území Mexika obsahují vysoké množství monoterpenoidů (55,51 %), vyšší množství monoterpenů (30,78 %), ale naopak nízké množství seskviterpenů (6 %) a hernandulcinu (0,5 %). Naopak rostliny nashromážděné v Portoriku obsahují velké množství hernandulcinu (58 %), seskviterpenoidů (16,59 %) seskviterpenů (4,93 %) a nízké hodnoty monoterpenoidů (7,52 %) a monoterpenů (0,62 %). Tím se liší i jejich využití. Z oblasti Mexika se rostliny využívají při stimulaci krve v pánevní oblasti, při menstruačních problémech, či na vyvolání potratu. Rostliny přirozeně se vyskytující v Portoriku se využívají na kašel, bronchitidů a zadržování moči (Souto-Bachiller, 1997).

### 2.3.5 *In vitro* množení *Lippia dulcis* Trev.

Jednou z metod využívaných při experimentech na rostlinách je mikropropagace, vegetativní způsob množení v *in vitro* podmínkách. Použije se malá část rostliny a odvodí se z ní velký počet malých jedinců. Rostliny se pěstují ve sterilním prostředí a živiny získávají z media. Media mohou mít různá složení a dá se tak velice přesně ovlivnit růst rostliny (Pavlová, 1992).

*In vitro* množení léčivých rostlin je velice významné pro získání mikropropagačních protokolů, v nichž jsou ucelené informace o složení media a o okolních podmínkách, jako je například množství světla či teplota, které dané rostlině vyhovují a napomáhají k plné regeneraci. A také pomohou posloužit jiným experimentům. Růst rostliny v *in vitro* podmínkách může se velice přesně ovlivnit, což pomáhá například v získání většího množství požadované látky, kterou rostlina obsahuje (Ortiza da Silva B. *et al.*, 2013; Boaduo *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015).

Rostliny *Lippia dulcis* Trev. obsahují hernandulcin (viz 2.2.4), látku s velice sladkou chutí bez kalorické hodnoty. Díky tomu se *Lippia dulcis* Trev. stává velice zajímavou pro potravinářské i farmaceutické využití (South-Bachiller, 1997).

Mezi prvními, kdo se zabýval kultivací rostliny *Lippia dulcis* Trev. v *in vitro* podmínkách byla Martina Sauerwein v roce 1991. Výchozím materiálem byly rostliny pěstované v květináčích, následně byly sterilizovány 70% etanolem a dezinfikovány 5% chloridem sodným. V experimentu bylo použito Murashige-Skoog medium (MS, 1962) se přídavkem 2 % sacharózy a 3% sacharózy a ½ MS médium, dále bylo použito B5 medium podle Gamborg *et al.* (1968) se 2 % sacharózy a WP medium podle Lloyd & McCown (1980) se 2 % sacharózy. Nodální segmenty rostlin byly kultivovány po dobu 4-6 týdnů, následně byly zváženy a porovnány množství obsaženého hernandulcinu. Bylo zjištěno, že produkce hernandulcinu je nižší u rostlin pěstovaných na tekutých médiích než u rostlých pěstovaných na pevných médiích, a nejvíce v mediích se 2 % sacharózy po uplynutí 10 dnů. Vyšší produkce hernandulcinu mezi 3 a 7mg/g byla také u B5 media a polovičního MS media, oproti 1,5 mg/g u WP media (Sauerwein *et al.*, 1991).

### **3. Cíl práce**

---

Hlavním cílem této práce bylo sledování vlivu cytokininů kinetinu (KIN) a 6-benzylaminopurinu (BAP) s přidavkem auxinu indolyl-3-octovou kyselinou (IAA) na růst a regeneraci rostlin z nodálních segmentů *Lippia dulcis* Trev. v *in vitro* podmínkách.

Cíle byly stanoveny na základě hypotézy, že cytokininy stimulují dělení buněk, tvorbu axilárních prýtů (Kováč, 1995) a mají pozitivní vliv na proliferaci buněk kalusu a auxiny indukují tvorbu kořenů, iniciaci vrcholových meristémů stonku a tvorbu kalusu (Pavlová, 1992).

## **4. Materiál a metodika**

---

### **4.1. Rostlinný materiál**

Pro experiment byla použita druhu *Lippia dulcis* Trev. kultivaru Colada, která byla získána od soukromého pěstitele Radima Slavíčka.

U pěstitele byla rostlina množena vegetativně pomocí hřížení, kdy se dlouhý šlahoun přivrne do země a zhruba po měsíci se od rostliny odstříhne, anebo řízkováním.

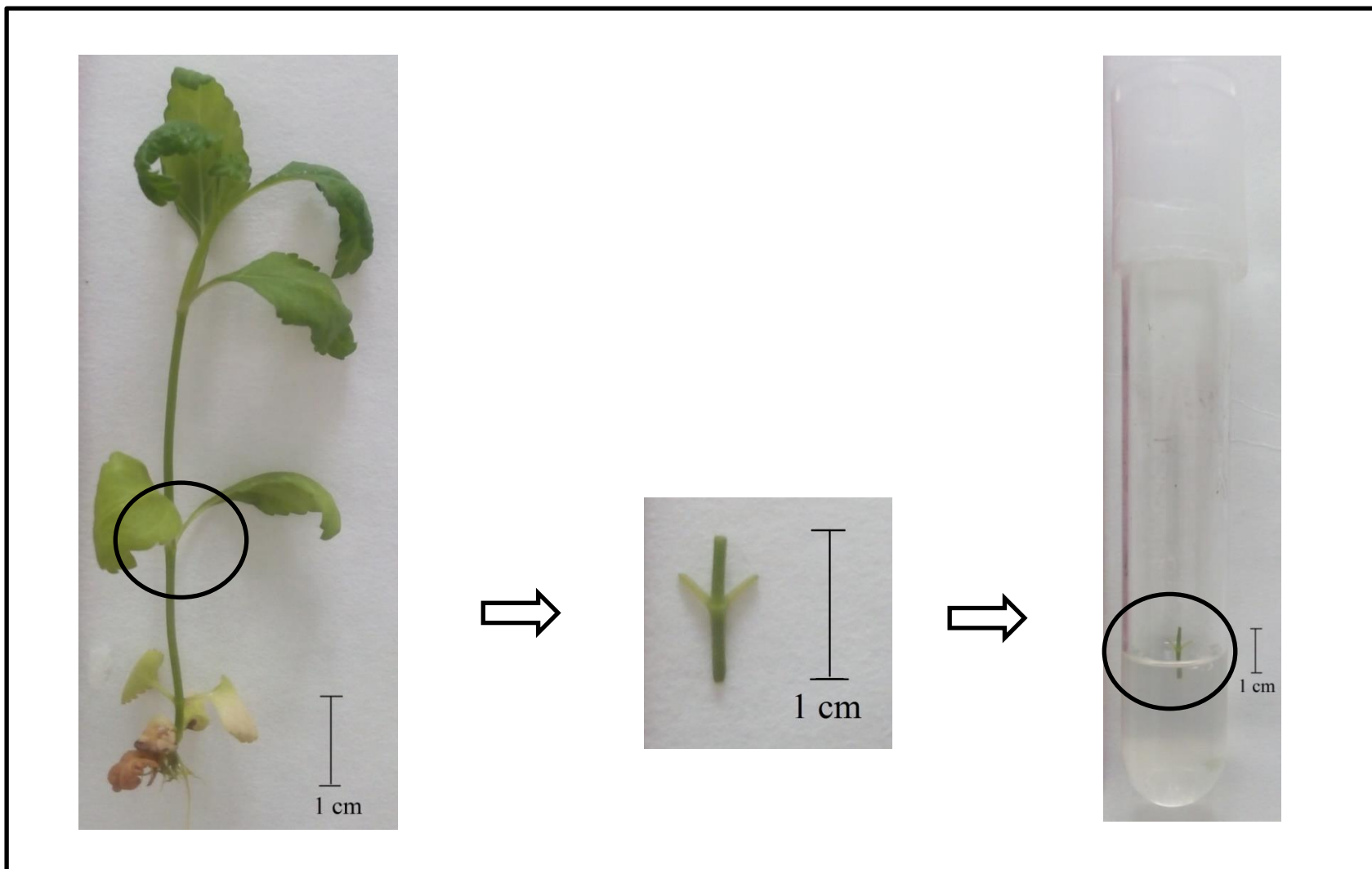
### **4.2. Metodika**

#### **4.2.1 Odvození aseptické kultury**

Pro experiment bylo potřeba namnožit rostlinný materiál. Mateřská rostlina *Lippia dulcis* Trev. byla nejprve rozřezána na jednonodální stonkové segmenty o velikosti 1 cm (viz Obrázek 8), jde tedy o produkci rostlin z axilárních pupenů. Dále byly odstraněny části listů v místě nad řapíky, aby nebylo poškozeno paždí listů, odkud se předpokládá růst nových výhonků.

Jelikož je nutné získat sterilní rostlinný materiál, prošly nodální segmenty sterilizací pomocí desinfekčních prostředků, tak aby se zničili plísně a bakterie, ale nedošlo k poničení rostlinného pletiva.

Nejprve byl rostlinný materiál důkladně omyt pod tekoucí vodou, poté v 70% etanolu po dobu jedné minuty. Následně byly explantáty opláchnuty destilovanou vodou a vloženy do kádinky s roztokem naředěného Sava (komerční název prostředku) a dvěma kapkami detergentu Tweenu. Účinnou látkou Sava je chlornan sodný (NaClO) a použité Savo obsahovalo 4,7 % NaClO. Ke sterilizaci se používá 1% NaClO, proto se muselo Savo naředit v poměru 1:4 s destilovanou vodou. Protože se efekt dezinfekce zvyšuje mícháním, byly explantáty v dezinfekčním roztoku vloženy na 20 minut do třepačky na 140 otáček. Poté byly explantáty v kádince přeneseny do flowboxu, kde byly již ve sterilních podmínkách propláchnuty třikrát destilovanou vodou, aby došlo k úplnému odstranění dezinfekčního prostředku. Následně byly položeny do Petriho misky na filtrační papír a ořezaly se poškozené konce explantátů. Tomu to procesu se také říká odvození aseptické kultury.



**Obrázek 8** Převod nodální segmentu rostliny *Lippia dulcis* Trev. na MS médium

Zdroj: vlastní zpracování autora, 2016

#### 4.2.2 Množení nodálních segmentů

Na množení rostlinného materiálu bylo použito Murashige-Skoogovo (MS, 1962) médium, které jsme vytvořili v laboratoři.

Médium se skládá z makroelementů, z nichž je hlavní dusík, fosfor, draslík, hořčík a síra. Z mikroelementů je nejvýznamnější železo, mangan, zinek, bór, měď a molybden (Kováč, 1995).

Koncentrace látek byla namíchána na 1 litr MS media ze zásobních roztoků A, B, C, D, E a V. Roztok A obsahuje hlavně dusík, draslík, vápník, fosfor a chlor. Roztok B síru, bór a mangan. Roztok C obsahuje draslík, jód, molybden a sodík. Roztok D měď, síru a kobalt. Roztok E obsahuje hlavně železo a sodík a poslední vitamínový roztok V obsahuje glycin, thiamin, pyridoxin a kyselinu nikotinovou. Roztoky byly předem připraveny v laboratoři a během experimentu se odměřovaly pomocí odměrných válců. Roztoku A se použilo 100ml a ostatních roztoků se přidalo po 10 ml.

Významným zdrojem uhlíku a energie je v médiu sacharóza. Na 1 litr MS média se navažuje 30 g sacharózy. Dále se navažuje 100 mg sacharidu Myo-inositolu a 8 g agaru. Agar je ztužující látka, která tuhne při 45°C (Kováč, 1995). Proto se musí nejdříve rozmíchat v destilované vodě a nechat rozehrát. Sacharóza a Myo-inositol byly rovnou přidány do kádinky s odměřenými roztoky.

Finální MS medium musí mít hodnotu pH 5,7, proto byla směs roztoků měřena na pH metru a hodnota pH se v případě potřeby snižovala kyselinou askorbovou nebo zvyšovala hydroxidem draselným (KOH) na požadovanou hodnotu. V poslední fázi byla kádinka s roztoky a navážkou sacharózy a Myo-inositolu přelita do odměrného válce s obsahem 1l. Přidal se rozehrátý agar rozmíchaný v destilované vodě a doplnila se destilovaná voda po rysku. Vše bylo promícháno, aby bylo médium rovnoměrně koncentrované.

Pro tento pokus bylo médium stejnoměrně rozlito do zkumavek a sterilizováno v autoklávu při teplotě 121°C, tlaku 100 kPa, po dobu 20 minut.

Sterilní explantáty byly vloženy do vysterilizovaných zkumavek na živné MS médium. Tento proces se nazývá pasážování, probíhá ve sterilních podmínkách ve flow-boxu. Do každé zkumavky byl vložen jeden nodální explantát o velikosti 1,5 cm, zkumavky byly zavíčkované a vrchní část byla překryta parafilmem, pro zvýšení



ochrany před kontaminací. Takto uzavřené zkumavky byly označeny popisky a umístěny do kultivační místnosti v prostorách laboratoře.

Pasážování se opakuje, dokud není namnoženo dostatečné množství rostlinného materiálu pro založení vlastního pokusu.

Nodální explantáty byly po přepasážování umístěny do kultivační místnosti v laboratoři. V kultivační místnosti je svítivost 3000 lx, fotoperioda s 16 hodinami dne a 8 hodinami noci, při teplotě 25°C ve dne a 20°C v noci.

Všechny zkumavky byly během kultivace pravidelně kontrolovány. Jejich zdravotní stav a hlavně jestli nedošlo ke kontaminaci (viz Obrázek 9). Riziko kontaminace bylo sníženo překrytím horních částí zkumavek fólií Parafilmem a během jakékoli manipulace se zkumavky, případně jejich umístění, dezinfikovalo 70% etanolem. V případě kontaminace byly napadené zkumavky vyřazeny a zlikvidovány.



**Obrázek 9** Ukázka kontaminace

Zdroj: vlastní zpracování autora, 2015

### 4.2.3 Vytvoření pokusných variant

Po namnožení dostatečného množství rostlinného materiálu, jsme vytvořili MS média s přidávanými růstovými regulátory pro sledování jejich vlivu na regeneraci rostliny, jakožto hlavního cíle bakalářské práce.

Bylo vytvořeno 6 variant MS média s odlišným množstvím RR a kontrolní varianta explantátů na čistém MS médiu pro lepší porovnání výsledků (viz Tabulka 1). Růstové regulátory byly do MS média přidávány před přidáním agar, přesným vypočtením odpovídající koncentrace a odměřením pomocí pipet.

**Tabulka 1** Varianty kultivačních médií

Varianta (označení)	Kultivační médiu	Růstové regulátory v médiu (mg/l)			Sacharóza (g/l)	Agar (g/l)	Myo-inositol (mg/l)	pH
		KIN	BAP	IAA				
1	MS	-	-	-	30,0	8,0	100,0	5,7
2 ( $\beta_1$ )		-	0,5	0,5	30,0	8,0	100,0	5,7
3 ( $\alpha_1$ )		0,5	-	0,5	30,0	8,0	100,0	5,7
4 ( $\beta_2$ )		-	0,75	0,5	30,0	8,0	100,0	5,7
5 ( $\alpha_2$ )		0,75	-	0,5	30,0	8,0	100,0	5,7
6 ( $\beta_3$ )		-	1,00	0,5	30,0	8,0	100,0	5,7
7 ( $\alpha_3$ )		1,00	-	0,5	30,0	8,0	100,0	5,7

Pro každou variantu experimentu bylo použito 25 nodálních segmentů o velikosti 1 cm. Převod rostlinných explantátů probíhal opět ve flow-boxu napasážením. Zkumavky byly překryty Parafilmem, označeny popisky a každá zkumavka byla očíslována, aby se správně zaznamenávalo pozdější měření.

Varianty byly rozlišeny popisky na zkumavkách pomocí římských písmen  $\alpha$  a  $\beta$  s číslem 1 pro koncentraci 0,5 mg/l, 2 pro 0,75 mg/l a 3 pro koncentraci 1,00 mg/l cytokininů kinetinu a 6-benzylaminopurinu. Všechny varianty obsahovaly 0,5 mg/l auxin indolyl-3-octovou kyselinu.

### 4.2.6 Hodnocení výsledků

Vytvořené varianty s růstovými regulátory byly kultivovány v kultivační místnosti. Každá varianta byla kultivována po dobu 6 týdnů. Během této doby byla

pravidelně jednou týdně prováděna měření. Hodnotily se parametry jako je regenerace, výška rostliny, počet výhonů a jejich délka, počet nodů, větvení, tvorba kalusu, hnědnutí listů, počet kořenů a jejich délka.

Získané výsledky byly zpracovány v programu Excel a ve statistickém softwaru IBM SPSS Statistics verze 22 a byly použity k vytvoření tabulky se statistickým vyhodnocením variant a dále pro vytvoření tabulky koeficientu mikropropagace.

## 5. Výsledky a diskuze

---

### 5.1 Odvození aseptické kultury a namnožení rostlinného materiálu

Odvození aseptické kultury bylo úspěšné. Z mateřské rostliny bylo použito 25 nodálních segmentů a proces sterilizace a pasážování úspěšně přežilo 22 z nich (88 %), což bylo dostatečné množství pro další namnožení.

Po 5-ti měsících bylo namnožené dostatečné množství rostlinného materiálu pro zahájení vlastního experimentu. Jako optimální postup při sterilizaci, využití nodálních segmentů a Murashige-Skoogovo média k množení rostlin tohoto rodu se shodují i studie Ahmed *et al.* (2005), Peixoto *et al.* (2006) a El-Harwary *et al.* (2012).

### 5.2. Vliv růstových regulátorů

Získané výsledky z měření experimentu této bakalářské práce jsou shrnuty v Tabulce 2 a 3, v Grafu 1-4 a také je přiložena fotodokumentace s ukázkou výsledků. Tabulka 2 obsahuje průměrné hodnoty a odchylky zpracované z měření.

**Regenerace:** Procento regenerace (viz Tabulka 2) rostlin z nodálních segmentů se pohybovalo v rozmezí 57,6 – 100 %. Nejvyššího procenta dosahovala varianta čistého MS média bez přidaných růstových regulátorů. Nejnižší procento regenerace (57,6%) bylo u varianty s přidavkem 0,5 mg/l KIN+0,5 mg/l IAA. Regenerace u variant s přidavkem růstových regulátorů značně klesala v průběhu experimentu, takže na konci kultivace (po 35 dnech) se většina rostlin již neregenerovala, což je dobře vidět na obrázcích 10-12. K poměrně nízké regeneraci po přidání růstových regulátorů BAP, NAA, IAA a KIN u druhu *Phyla nodiflora* L. z rodu *Lippia* dospěla i studie Ahmed *et al.* (2005), kdy docházelo k průměrné regeneraci okolo 56 %.

**Tvorba kalusu:** Během experimentu byla u variant s přidanými růstovými regulátory vyzkoušována tvorba kalusu (viz Tabulka 3). Hlavně u koncentrací 0,5 mg/l KIN+0,5 mg/l IAA (viz obrázek 10). Gupta *et al.* (2001) a El-Hawary *et al.* (2012) též vyzkoušovali tvorbu kalusu při přidání kombinace auxinů a cytokininů do média při kultivaci druhu *Lippia citriodora* Kunth a *Lippia alba* rostlin z rodu *Lippia*.

**Počet výhonů:** Z hlediska počtu vytvořených výhonů je dle tabulky 2 patrné, že se průměrný počet výhonů pohyboval v rozmezí 1-2 výhony. Průměrně jeden výhon

tvorily varianty s přídavkem růstových hormonů v koncentraci 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA a s media s přídavkem 1,0 mg/l KIN + 0,5 mg/l IAA. Dva výhony tvořily převážně varianty s čistým MS médiem a s koncentrací 0,75 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA. Mezi variantou s čistým MS médiem a variantami 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA a 1,0 mg/l KIN + 0,5 mg/l IAA jsou statisticky rozdíly. Vzhledem k nízkým hodnotám u těchto variant s RR je jasné, že přídavek RR nemá na počet výhonů pozitivní vliv. Průměrná tvorba dvou výhonů u druhu *Phyla nodiflora* L z rodu *Lippia* je potvrzena i ve studii Ahmed *et al.* (2005).

**Délka výhonů:** Z obrázků 10-12, z grafu 1 i ze tabulky 2 je jasné, že k vytvoření průměrně nejdelších výhonů ( $3,05 \pm 1,42$ ) docházelo u varianty s čistým MS médiem, mezi touto variantou a variantami s přídavkem RR jsou statisticky významné rozdíly. Nejnižších průměrných hodnot dosahovaly varianty s přídavky 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA, 0,75 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA a 0,75 mg/l KIN + 0,5 mg/l IAA. Studie Urrea *et al.* (2009) dospěla k podobnému výsledku u experimentu na *Lippia dulcis* Trev., kdy docházelo při kultivaci na médiu s přídavkem 1,0 mg/l BAP k vývoji axilárních pupenů, ale výrazně se snižovala délka výhonů, kdežto explantáty kultivované na čistém MS médiu dosahovaly 2,5-3,4 cm. Naproti tomu ve studii Peixoto *et al.* (2006) docházelo při experimentu na druhu *Lippia follifolia* Mart. and Schauer Ex Schauer z rodu *Lippia* k vytvoření nejdelších výhonů v *in vitro* podmínkách na kultivačním médiu s přídavkem 0,02 mg/l auxinu NAA.

**Počet nodů:** Z grafu 2 je vidět, že v průběhu měření u varianty s čistým MS médiem bez přídavku RR počet průměrně vytvořených nodů rovnoměrně rostl až na nejvyšší hodnotu z celého měření  $5,79 \pm 2,4$  nodů na původní explantát. Podle tabulky 2 je jasné, že mezi variantou s čistým MS médiem a médiem s RR jsou statistické rozdíly, ale ani u jedné varianty nedocházelo k lepším dosaženým výsledkům na počet průměrně vytvořených nodů. Nejnižších hodnot  $0,8 \pm 0,96$  dosahovala varianta s přídavkem 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA. Počet průměrně vytvořených nodů je významným parametrem pro další výpočet koeficientu mikropropagace. Studie Urrea *et al.* (2009) dospěla při mikropropagaci *Lippia dulcis* Trev. k nejvyššímu počtu vytvořených nodů (4,5) u varianty s kultivačním médiem s přídavkem 1 mg/l BAP.

**Počet kořenů:** Ve statistické tabulce 2 je vidět, že průměrný počet vytvořených kořenů se u jednotlivých variant značně lišil. Od nejvyšších hodnot  $7,35 \pm 3,1$  u varianty s čistým MS médiem po nejnižší hodnotu  $0,14 \pm 0,36$  u varianty s přidavkem  $1,0 \text{ mg/l BAP} + 0,5 \text{ mg/l IAA}$ . Dle statistiky jsou mezi nejlépe vycházejícími variantami (varianta s čistým MS médiem, varianta s přidavkem  $0,5 \text{ mg/l KIN} + 0,5 \text{ mg/l IAA}$ ) a zbylými variantami statistické rozdíly, což naznačuje, že přidavky růstových regulátorů, zvláště ve vyšších koncentracích nemají příznivý vliv na počet průměrně vytvořených kořenů. Z grafu 3 je patrné, že u variant s přidavky RR nedocházelo k velkým změnám v průběhu kultivace. K rovnoměrnému zvyšování počtu kořenů v průběhu experimentu docházelo optimálně u varianty s čistým MS médiem. K nejlepší tvorbě kořenů na čistém MS médiu oproti kultivaci na MS s přidavkem růstových regulátorů dospěla i studie Gupta *et al.* (2001) při mikropropagaci *Lippia alba*. Kdy na čistém médiu docházelo k vytvoření kořenů ze 100 % a na kultivačních médiích s přidavkem  $0,5 \text{ mg/l NAA}$  pouze z 10 %.

**Délka kořenů:** Z hlediska průměrné délky kořenů se hodnoty pohybovaly od nejvyššího čísla  $2,76 \pm 1,35$  opět u varianty s čistým MS médiem po velice nízké číslo  $0,02 \pm 0,58$  u varianty s přidavkem  $1,0 \text{ mg/l BAP} + 0,5 \text{ mg/l IAA}$ . Z tabulky 2 je patrné, že mezi jednotlivými variantami jsou statisticky významné rozdíly, avšak žádná z variant s přidavkem RR nedosahuje lepších výsledků, než varianta s čistým MS médiem. Z grafu 4 je vidět, že u variant s přidavkem 6-benzylaminopurinu (BAP) se délka kořenů v průběhu experimentu téměř neměnila. Kdežto u varianty s čistým MS médiem byl růst kořenů rovnoměrný. Ve studii Peixeto *et al.* (2006) o mikropropagaci *Lippia follifolia* Mart. and Schauer Ex Schauer oproti tomu docházelo k vytvoření nejdelších kořenů (2,404 cm) v *in vitro* podmínkách při kultivaci rostlin na médiu s přidavkem  $0,04 \text{ mg/l NAA}$ .

**Koeficient mikropropagace:** Účinnost mikropropagace je hodnocena koeficientem mikropropagace, nebo také množitelským koeficientem, který nám ukazuje kolik lze vytvořit nových rostlin (v případě tohoto experimentu nově vytvořených nodů) z explantátů za časové období. Výsledky této práce jsou zobrazeny v tabulce 3. Koeficient mikropropagace se po 30-ti dnech (doba subkultivace) pohybuje od 1:1,72 do 1:4,64 (to znamená 1,72 a 4,64 nově vytvořených nodů na jeden původní nodální explantát). Teoretický počet vytvořených nových rostlin se pohyboval

v rozmezí 670 až 99 590 007 rostlin. I v tomto případě si nejlépe vedla varianta s čistým MS médiem bez přidaných růstových regulátorů, u které bylo dosaženo nejvyšších výsledků (99 590 007 nově vytvořených rostlin/rok). Nejnižší číslo (670) nově vytvořených rostlin bylo u varianty s přídavkem 0,75 mg/l KIN+0,5 mg/l IAA. Vypočet je ale pouze teoretický, nejsou do něj zahrnuty faktory kultivačních podmínek, které na explantáty působí, jako je například kontaminace.

**Tabulka 2** Vliv růstových hormonů na růst nodálních explantátů *Lippia dulcis* Trev. v *in vitro* podmínkách (Kruskal-wallisův test,  $p < 0,05$ )

Kultivační médium	KIN (mg/l)	BAP (mg/l)	IAA (mg/l)	Regenerace (%)	Průměrný počet výhonů	Průměrná délka výhonů (cm)	Průměrný počet nodů	Průměrný počet kořenů	Průměrná délka kořenů (cm)
MS	-	-	-	100	1,95 ± 0,35 <sup>a</sup>	3,05 ± 1,42 <sup>a</sup>	5,79 ± 2,4 <sup>a</sup>	7,35 ± 3,1 <sup>a</sup>	2,76 ± 1,35 <sup>a</sup>
	0,5	-	0,5	57,6	1,57 ± 0,53 <sup>a</sup>	2,36 ± 2,06 <sup>ac</sup>	3,43 ± 1,99 <sup>a</sup>	4,71 ± 3,73 <sup>a</sup>	2,51 ± 2,26 <sup>acd</sup>
	0,75	-	0,5	60,32	1,67 ± 2,08 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,26 <sup>abc</sup>	1,67 ± 2,08 <sup>ab</sup>	1,33 ± 1,52 <sup>ab</sup>	0,23 ± 0,4 <sup>ab</sup>
	1,0	-	0,5	91,68	0,85 ± 0,91 <sup>b</sup>	0,81 ± 0,87 <sup>bc</sup>	0,9 ± 0,94 <sup>b</sup>	1,0 ± 2,19 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,31 <sup>bc</sup>
	-	0,5	0,5	66,4	0,8 ± 0,96 <sup>b</sup>	0,11 ± 0,15 <sup>bc</sup>	0,8 ± 0,96 <sup>b</sup>	1,6 ± 3,08 <sup>b</sup>	0,12 ± 0,2 <sup>bd</sup>
	-	0,75	0,5	64,8	1,87 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,14 <sup>bc</sup>	1,31 ± 1,66 <sup>b</sup>	3,31 ± 2,44 <sup>ab</sup>	1,51 ± 1,76 <sup>ac</sup>
	-	1,0	0,5	83,4	1,57 ± 0,51 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,96 <sup>bc</sup>	1,64 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,14 ± 0,36 <sup>b</sup>	0,02 ± 0,58 <sup>b</sup>

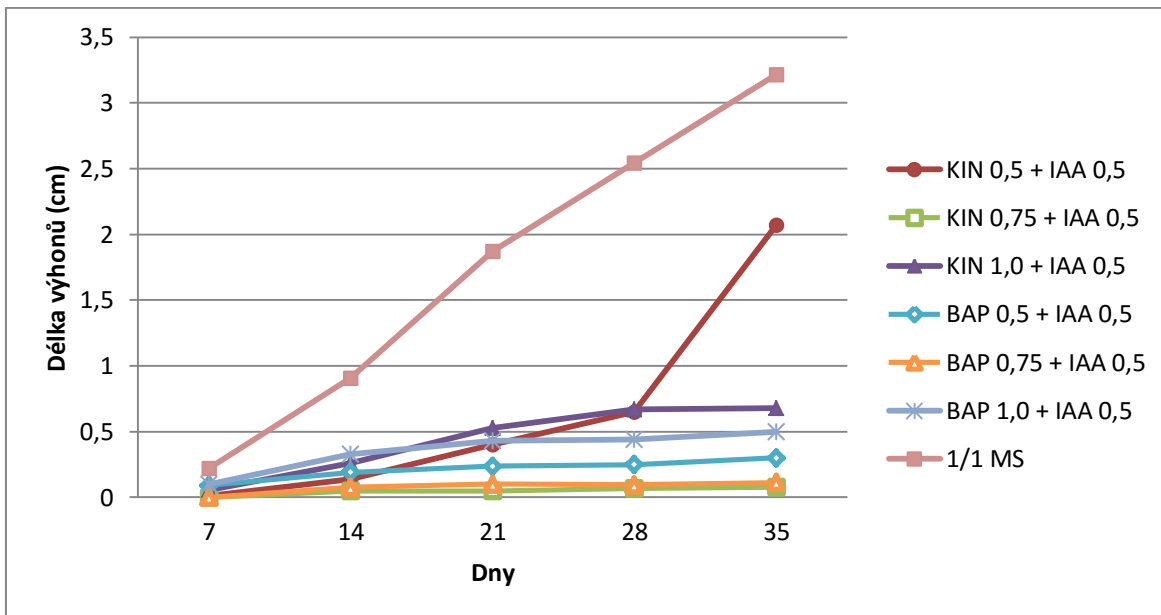
Zdroj: Vlastní zpracování autora, 2016



**Tabulka 3** Účinnost mikropropagace v závislosti na „koeficientu mikropropagace“ orgánových kultur *Lippia dulcis* Trev. z složených z nodálních segmentů, kultivovaných s přísávkou růstových hormonů

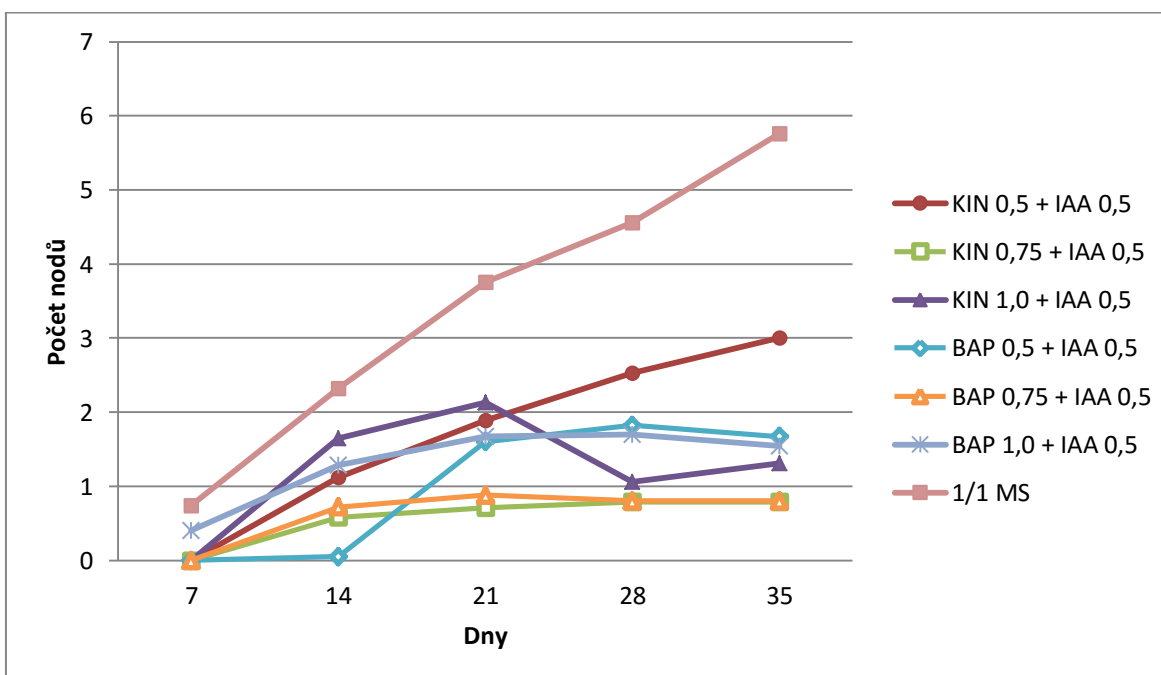
<b>Kultivační médium</b>	<b>KIN (mg/l)</b>	<b>BAP (mg/l)</b>	<b>IAA (mg/l)</b>	<b>Tvorba kalusu</b>	<b>Doba subkultivace (ve dnech)</b>	<b>Koeficient mikropropagace (<i>k</i>)</b>	<b>Počet subkultivací za rok (<i>p</i>)</b>	<b>Teoretický počet získaných rostlin za rok</b>
MS	-	-	-	-	30	1:4,64	12	99 590 007
	0,5	-	0,5	+	30	1:2,53	12	68 778
	0,75	-	0,5	+	30	1:1,72	12	670
	1,0	-	0,5	+	30	1:2,13	12	8 721
	-	0,5	0,5	-	30	1:1,94	12	2 842
	-	0,75	0,5	+	30	1:1,82	12	1 321
	-	1,0	0,5	+	30	1:1,79	12	1 082

Zdroj: Vlastní zpracování autora, 2016



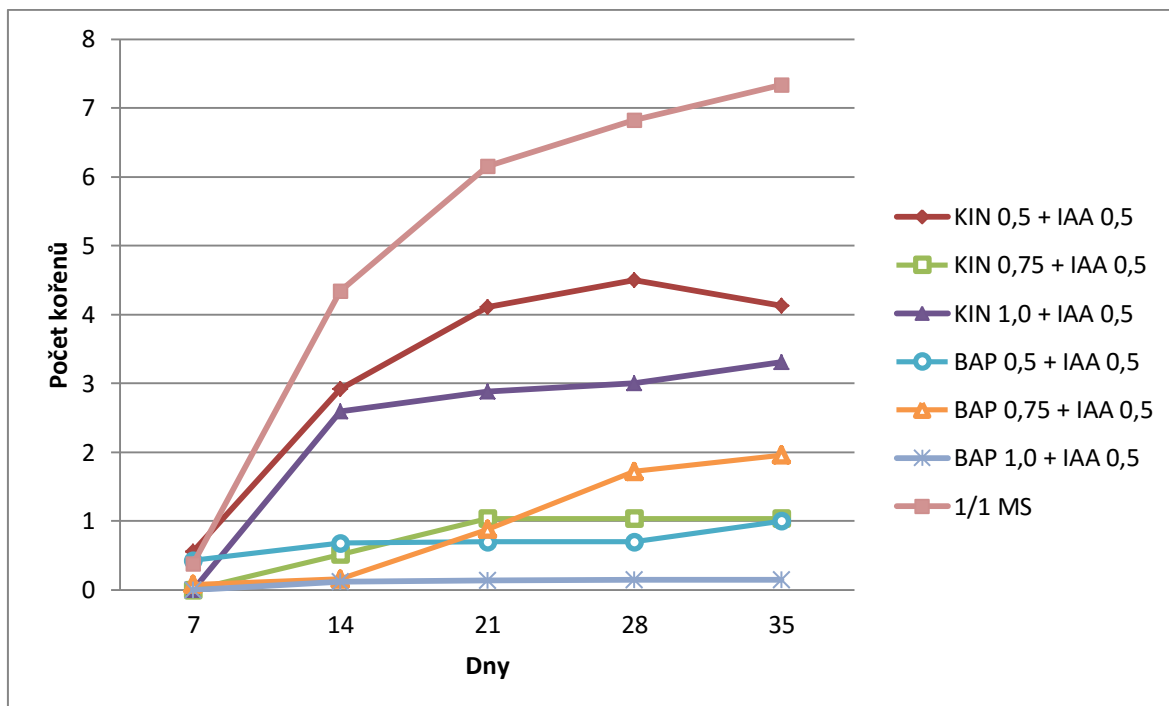
**Graf 1** Vliv auxinu a cytokininů na průměrnou délku výhonů u *Lippia dulcis* Trev. po 35 dnech kultivace

Zdroj: Vlastní zpracování autora, 2016



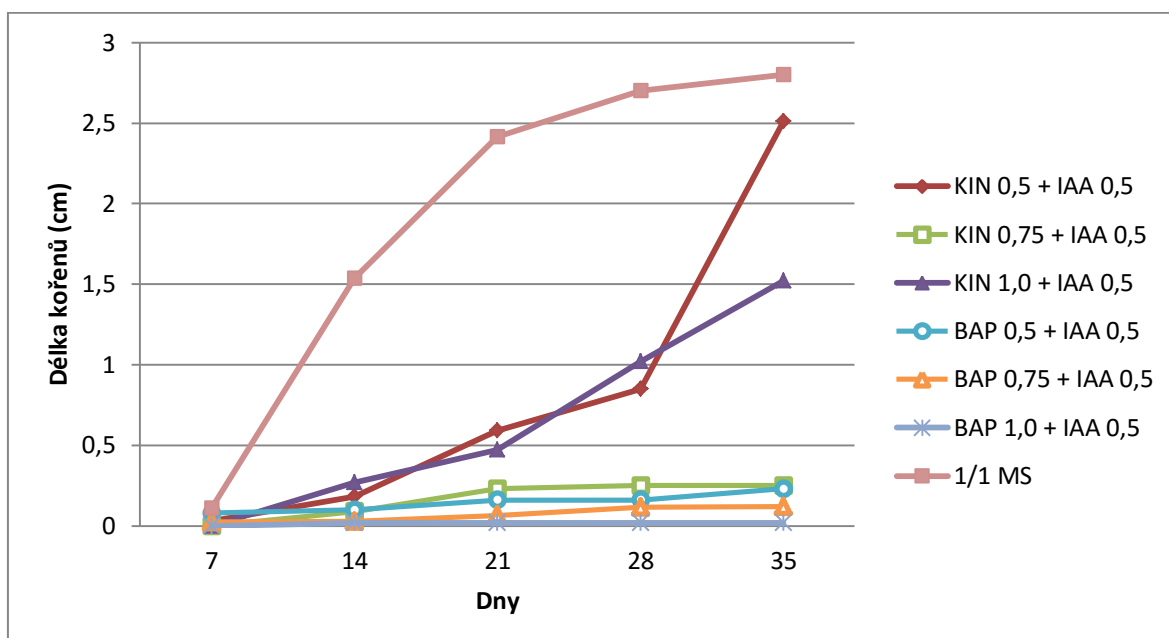
**Graf 2** Vliv auxinu a cytokininů na počet nodů u *Lippia dulcis* Trev. po 35 dnech kultivace

Zdroj: Vlastní zpracování autora, 2016



**Graf 3** Vliv auxinu a cytokininů na počet kořenů u *Lippia dulcis* Trev. po 35 dnech kultivace

Zdroj: Vlastní zpracování autora, 2016



**Graf 4** Vliv auxinu a cytokininů na průměrnou délku kořenů u *Lippia dulcis* Trev. po 35 dnech kultivace

Zdroj: Vlastní zpracování autora, 2016



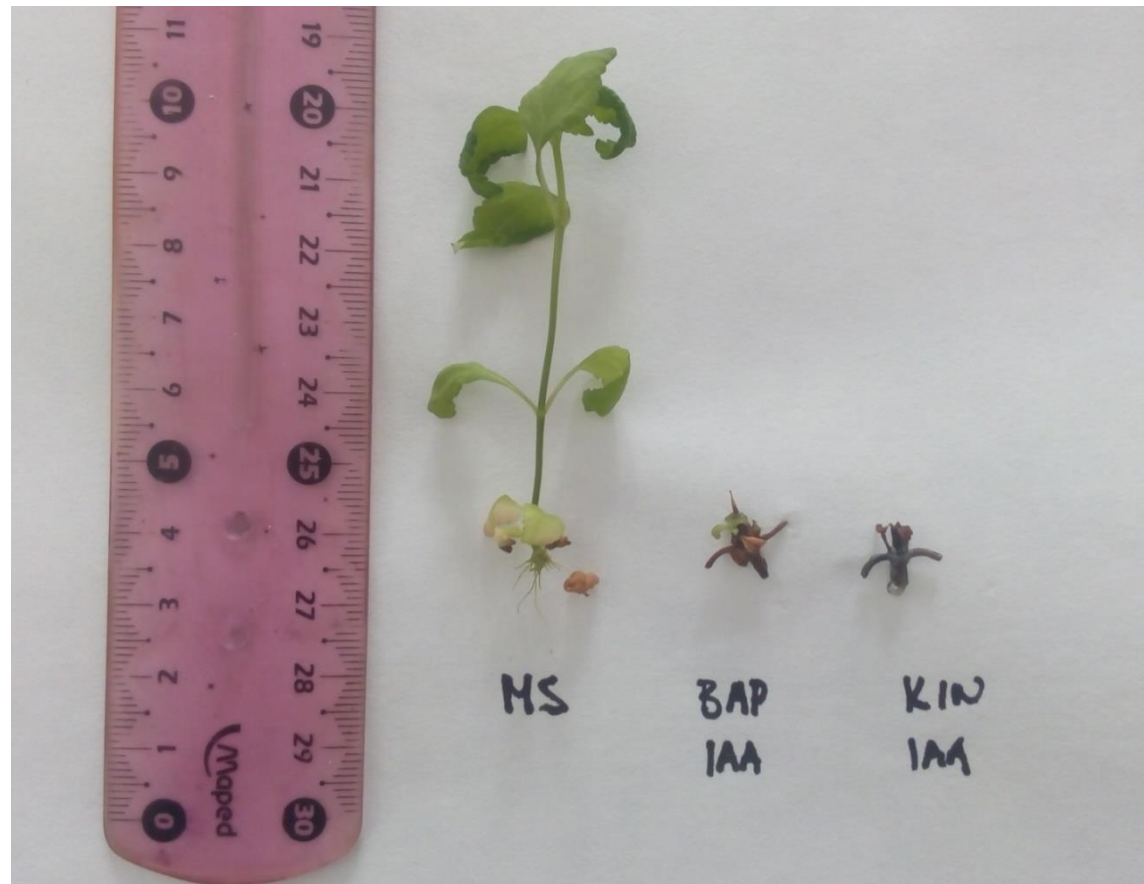
**Obrázek 10** Fotodokumentace z experimentu mikropropagace *Lippia dulcis* Trev., regenerace z nodálních explantátů kultivovaných na MS médiu s přidavky 0,5 mg/l KIN+ 0,5 mg/l IAA; 0,5 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA a čistém MS jako kontrolní varianta po 30-ti dnech kultivace

Zdroj: Vlastní zpracování autora, 2015



**Obrázek 11** Fotodokumentace z experimentu mikropropagace *Lippia dulcis* Trev., regenerace z nodálních explantátů kultivovaných na MS médiu s přidavky 0,75 mg/l KIN+ 0,5 mg/l IAA; 0,75 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA a čistém MS jako kontrolní varianta po 30-ti dnech kultivace

Zdroj: Vlastní zpracování autora, 2015



**Obrázek 12** Fotodokumentace z experimentu mikropropagace *Lippia dulcis* Trev., regenerace z nodálních explantátů kultivovaných na MS médiu s přidavky 1,0 mg/l KIN+ 0,5 mg/l IAA; 1,0 mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA a čistém MS jako kontrolní varianta po 30-ti dnech kultivace

Zdroje: Vlastní zpracování autora, 2016

## **7.Závěr**

---

Předložená bakalářská práce se zabývala mikropropagací Lípie sladké (*Lippia dulcis* Trev.), kde bylo hlavním cílem sledovat vliv auxinů a cytokininů na regeneraci a růst rostlin z nodálních segmentů ve sterilních *in vitro* podmínkách.

Dle získaných výsledků bylo zjištěno, že kultivační médium s kombinací auxinu a cytokininů nemá příznivý vliv na regeneraci a růst explantátů Lípie sladké a jako optimální se ukázala varianta s kultivačním MS médiem bez přidaných růstových regulátorů (kinetin, 6-benzylaminopurin, kyselina indoly-3-octová).

Dále by bylo vhodné zkoumat vliv růstových regulátoru odděleně, ne v kombinaci (cytokinin+ auxin).

## 8. Reference

---

Veškerá použitá literatura a zdroje informací a obrázků v této bakalářské práci byly citovány podle závazných pravidel FTZ.

**Adams RP, Weerasooriya A, Gao M.** 2014. Comparison of volatile leaf terpenoids from *Lippia dulcis* (Verbenaceae) obtained by steam distillation and pentane liquid extraction. *Phylogia* 96 (3): 252 -259.

Veškerá použitá literatura a zdroje informací a obrázků v této bakalářské práci byly citovány podle závazných pravidel FTZ.

**Ahmed ABA, Gouthaman T, Rao SA, Rao MV.** 2005. Micropropagation of *Phyllanthus nodiflora* (L.) Greene: An important medicinal plant. *Iranian Journal of Biotechnology* 3:186-190.

**Attia M, Kim S, Ro D.** 2012. Molecular cloning and characterization of (+) – epi-  $\alpha$ -bisabolol synthase, catalyzing the first step in the biosynthesis of the natural sweetener, hernandulcin, in *Lippia dulcis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 527: 37-44.

**Boaduo NKK, Katerere D, Eloff JN, Naidoo V.** 2014. Evaluation of six plants species used traditionally in the treatment and control of diabetes mellitus in South Africa using in vitro methods. *Pharmaceutical Biology* 52 (6): 756-761.

**Carlos Velazco** (2006) Flickr. Available at <https://www.flickr.com/photos/aztekium/197713507/>: Accessed at 2016-02-22.

**Compadre CM, Robbins E F, Kinghorn AD.** 1986. The intensely sweet herb, *Lippia Dulcis* Trev.: Historical uses, field inquiries, and constituents. *Journal of Ethnopharmacology* 15: 89-106.

**El-Harwary SS, Yousif MF, Motaal AAA, Abd-Hameed L.** 2012. Bioactivities, phenolic compounds and in-vitro propagation of *Lippia citriodora* Kunth cultivated in Egypt. *Bulletin of Faculty of Pharmacy* 50: 1-6.



**Global Biodiversity Information Facility.** 2013. GBIF.cz. Available at <http://www.gbif.org/species/5667349> : Accessed 2016-02-05.

**Gulich V.** 2015. Botany.cz. Available at <http://botany.cz/cs/phyla-scaberrima/>: Accessed 2015-03-21.

**Gupta SK, Khanuja SPS, Kumar S.** 2001. In vitro micropropagation of *Lippia alba*. Current Science 81: 206-210.

**Chembase.cn** (2015) Available at <http://en.chembase.cn/substance-172496.html>: Accessed 2015-12-05

**Chen B, Zhang J, Wu Z, Fan H, Li Q.** 2015. In vitro propagation of *Ardisia mamillata* Hance. Agricultural Science & Technology 16(10): 2159-2161

**Jindřiška Vančurová** (2015) Available at <http://botany.cz/cs/phyla-scaberrima/>: Accessed at 2016- 02-26.

**Khaled Saifullah Taronga** (2015) Available at <http://www.flickrriver.com/photos/125773355@N04/17014835571/>: Accessed at 2016-02-26.

**Kováč J.** 1995. Explantátové kultury rostlin. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. 142 s.

**Lloyd G & McCown B.** 1981. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. International Plant Propagators' Society. 30: 421-427.

**Mapasvěta.info** (2015) Available at [http://mapasveta.info/amerika/stredni\\_amerika\\_mapa.html](http://mapasveta.info/amerika/stredni_amerika_mapa.html): Accessed at 2015-12-05.

**Marcelo Guerra Santos** (2015) Instituto Mesa. Available at <http://institutomesa.org/projects/the-baldia-pharmacy-of-boa-viagem/erva-cidreira-lippia-alba-foto-marcelo-guerra-santos-4/?lang=en>: Accessed 2016-03-29.

- Marla Ignez Calhau** (2013) Flickr. Available at <https://www.flickr.com/photos/ignezmotta/11254250556>: Accessed 2016-02-26.
- Munir AA**, 1993, A taxonomic revision of the genus *Lippia* linn. (Verbenaceae) in Australia, J Adelaide Bot.Gard. 15: 129-145.
- Murashige T, Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Novák J, Skalický M.** 2012. Botanika. Praha: Poweprint. 336 p.
- Ortiza da Silva B, Amaral ACF, Ferreira JLP, Santiago LJM.** 2013. Micropropagation and in vitro production of secondary metabolites of *Croton floribundus* Spreng.. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant 49: 366-372.
- Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A.** 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. Journal of Ethnopharmacology 76: 201-214.
- Pavlová L.** 1992. Kulty rostlin in vitro. Česká zemědělská univerzita v Praze. Agronomická fakulta. Nепublikovaná skripta.
- Peixoto PHP, Salimena FRC, Santos MDO, Da Salva Garcia L, Pierre PMDO, Viccini LF, Otoni WC.** 2006. In vitro propagation of endangered *Lippia filifolia* Mart. and Schauer ex Schauer. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 42: 558-561.
- Salimena FRG, Múlgura ME.** 2015. Notas taxonômicas em *Verbenaceae* do Brasil. Rodriguésia 66(1): 1-7.
- Sauerwein M, Flores HE, Yamazaki T, Shimomura K.** 1991. *Lippia dulcis* shoot cultures as a source of sweet sesquiterpene hemanulcin. Plant Cell Reports 9: 663-666.
- Small E.** 2006. Velká kniha koření, bylin a aromatických rostlin. Praha. Volvox Globator. 1021 p.

**Souto-Bachiller, Fernando A, De Jesus-Echevarría M, Cárdenas-González OE, Acuña-Rodríguez MF, Meléndez PA, Romero-Ramsey L.** 1997. Terpenoid composition of *Lippia dulcis*. *Phytochemistry* 44(6): 1077-1086.

**Urrea AI, Castrillón PA, Monsalve Z.** 2009. Propagación in vitro y desdiferenciación tisular en *Lippia dulcis*. *Actu Biol* (31): 21-29.

**Zuccardini P.** 2009. Camphor: risks and benefits of widely used natural product. Italy. University of Port Harcourt. 69-74 p.

## **Přílohy**

---

### **Seznam příloh**

Příloha 1 Vykvetlá rostlina <i>Lippia dulcis</i> v <i>in vitro</i> podmínkách.....	36
Příloha 2 Složení kultivačního MS media .....	37
Příloha 3 Vylisovaná rostlina <i>Lippia dulcis</i> Trev. kultivovaná na čistém MS médiu .....	38



**Příloha 1** Vykvetlá rostlina *Lippia dulcis* v *in vitro* podmínkách kultivaná na MS médiu s přídavkem 6- benzylaminopurinu

Zdroj: Vlastní zpracování autora, 2015

**Příloha 2** Složení kultivačního MS media

Zásobní roztoky do 1 litru destilované H <sub>2</sub> O		Navážka na 1 litr zásobního roztoku	Medium pH 5,7 na 1 litr odměřit
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5 g	100 ml
	KNO <sub>3</sub>	19 g	
	CaCl <sub>2</sub>	3,3 g	
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3,7 g	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7 g	
B	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620 mg	10 ml
	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O (H <sub>2</sub> O)	2,23 g (1,69 g)	
	ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O (7H <sub>2</sub> O)	560 mg (1,06 g)	
C	KI	83 mg	10 ml
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	25 mg	
D	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	2,5 mg	10 ml
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2,5 mg	
E	Na <sub>2</sub> EDTA	3,72 mg	10 ml
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2,78 mg	
V	kyselina nikotinová	50 mg	10 ml
	pyridoxin (B6)	50 mg	
	thiamin (B1)	10 mg	
	glycin (aminokyselina)	200 mg	

Přímá navážka do média: Myoinositol 100 mg

Sacharóza 30 g

Agar 8 g

Zdroj: Murashige & Skoog, 1962



**Příloha 3** Vylisovaná rostlina *Lippia dulcis* Trev. kultivaru Colada kultivovaná na čistém MS médiu

Zdroje: Vlastní zpracování autora, 2016